

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: **0 275 796 B1**

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

(45) Date de publication de fascicule du brevet: 25.03.92 (51) Int. Cl.⁵: **B01J 13/00, A61K 9/50**

(21) Numéro de dépôt: 87402997.8

(22) Date de dépôt: 28.12.87

(54) Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules.

(30) Priorité: 31.12.86 FR 8618446

(43) Date de publication de la demande:
27.07.88 Bulletin 88/30

(45) Mention de la délivrance du brevet:
25.03.92 Bulletin 92/13

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(56) Documents cités:
WO-A-86/03676
AU-A- 495 261
CH-A- 201 942
DE-C- 738 604

(73) Titulaire: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
15, quai Anatole France
F-75007 Paris(FR)

(72) Inventeur: Fessi, Hatem
9, rue Friant
F-75014 Paris(FR)
Inventeur: Devissaguet, Jean-Philippe
14 Bd d'Inkermann
F-92200 Neuilly/Seine(FR)
Inventeur: Puisieux, Francis
66 rue de Strasbourg
F-94700 Maisons Alfort(FR)
Inventeur: Thies, Curt
305 Fawn Meadows
Saint Louis(US)

(74) Mandataire: Varady, Peter et al
Cabinet Lavoix 2, Place d'Estienne d'Orves
F-75441 Paris Cedex 09(FR)

EP 0 275 796 B1

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition (art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

La présente invention a pour objet un nouveau procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de particules sphériques de type matriciel et de taille inférieure à 500 nm (nanoparticules).

Des particules submicroscopiques d'un diamètre inférieur à 500 nm sont déjà connues notamment d'après les brevets BE-A-808 034, BE-A-839 748, BE-A-869 107 et FR-A-2 504 408. Selon BE-A-808 034 et -839 748, les particules submicroscopiques sont formées par polymérisation micellaire d'un monomère tel qu'un dérivé de l'acide acrylique. De même, BE-A-869 107 et FR-A-2 504 408 décrivent la préparation de nanoparticules biodégradables obtenues par polymérisation d'un cyanoacrylate d'alkyle et contenant une substance biologiquement active. Les méthodes font appel à une polymérisation en solution et sont donc limitées à l'utilisation d'un nombre limité de polymères pouvant être obtenus notamment par vinyl-addition et ne peuvent convenir à des polymères naturels ou hémisynthétiques. De plus il est difficile de maîtriser le poids moléculaire du polymère constitutif des nanoparticules et il est nécessaire, notamment en vue d'usage biologique, d'éliminer les monomères et oligopolymères résiduels, le cas échéant les réactifs de polymérisation (initiateur et catalyseur) en excès, ainsi que les surfactifs s'ils sont utilisés à forte concentration ou ne sont pas biocompatibles. Or la purification (ultracentrifugation, dialyse) s'avère souvent lourde, car la filtration des nanoparticules, vu leur taille, n'est pas toujours possible.

On a aussi décrit des méthodes par émulsification-évaporation, faisant appel à des polymères préformés et selon lesquelles une solution organique de polymère non miscible à l'eau est émulsifiée dans une phase continue aqueuse, puis le solvant est évaporé afin de conduire à une suspension de polymère insoluble dans l'eau. Cependant, si l'intérêt majeur de cette méthode est d'être utilisable pour de nombreux polymères d'origine synthétique ou hémisynthétique et de permettre ainsi l'obtention de nanoparticules à partir de polymères bien définis, son inconvénient réside dans la difficulté de réaliser des émulsions ultrafines et homogènes pour l'obtention de nanoparticules inférieures à 500 nm qui seraient elles-mêmes de taille homogène. De plus, la nécessité d'utilisation de surfactifs dans des proportions souvent importantes (20%) et qui devront être éliminés, et la mise en oeuvre d'appareillages sophistiqués et gourmands en énergie (sonicateurs, homogénéiseurs...) constituent des handicaps sérieux à leurs applications industrielles.

On a aussi proposé l'obtention de nanoparticules dans le cas des protéines, notamment par

dénaturation à chaud d'une émulsion eau dans l'huile d'une solution protéique, telle que l'albumine, (Kramer, P. A : J. Pharm. Sci., 63, 1646 (1974), ou par désolvatation d'une solution protéique, telle que la gélatine, par un sel minéral ou l'éthanol (Marty et coll., dans Austr. J. Pharm. Sci., 6, 65 (1978), ou dans Pharm. Acta Helv. 53, Nr. 1 (-1978)), puis, dans les deux cas, par durcissement au moyen d'un aldéhyde. La méthode de Kramer a pour inconvénient principal de nécessiter une émulsification préalable de la solution aqueuse de la matière première macromoléculaire dans une phase continue huileuse. Cette émulsion devant être très fine, l'utilisation de surfactifs et d'appareillages ad-hoc (sonicateur, etc) est indispensable pour obtenir des nanoparticules de taille convenable. Quant à la méthode de Marty, elle fait appel à des quantités importantes de sels minéraux qu'il faut éliminer, de même que l'excès d'aldéhyde et le sulfite ou le métabisulfite utilisé pour neutraliser ce dernier.

Par ailleurs, AU-A-495 261 décrit un procédé de préparation de nanoparticules de 10 à 1000 nm à base d'une matière de macromolécules naturelles réticulées, utilisant une méthode de désolvatation/fixation.

CH-A-201 942 décrit un procédé de préparation de saumures ou de suspensions aqueuses de particules de substances organiques et de protéines.

Le document FR-A-1 571 090 décrit un procédé de préparation de microcapsules de matières huileuses avec paroi polymère utilisant une méthode par dilution.

Toutes les méthodes décrites ci-dessus ne sont applicables qu'à certaines catégories de molécules et font intervenir des opérations coûteuses (ultracentrifugation, sonication, etc) ou difficilement contrôlables (polymérisation), tout en ne permettant pas d'obtenir une homogénéité satisfaisante de la taille des particules ou même des particules suffisamment petites (inférieures à 500 nm) pour assurer leur stabilité à long terme sous forme d'une suspension colloïdale.

L'invention propose un nouveau procédé de préparation de nanoparticules, ne présentant pas les désavantages précédents et utilisable aussi bien pour des substances polymériques synthétiques et naturelles que pour diverses substances organiques (médicaments, lipides, etc) ou minérales (sels, pigments, etc), ainsi que leurs mélanges.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de particules sphériques de type matriciel et de taille inférieure à 500 nm. (nanoparticules), caractérisé en ce que :

(1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de la substance

dans un solvant ou dans un mélange de solvants, et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs,

(2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par un non-solvant ou un mélange de non-solvants de la substance et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs, le non-solvant ou le mélange de non-solvants de la substance étant miscible en toutes proportions au solvant ou mélange de solvants de la substance,

(3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre, de manière à obtenir une suspension colloïdale de nanoparticules de la substance, et

(4) si l'on désire, on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants de la substance et du non-solvant ou du mélange de non-solvants de la substance, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanoparticules ou à obtenir une poudre de nanoparticules,

étant entendu que ladite substance n'est pas un monomère.

Dans l'étape (3), les nanoparticules se forment pratiquement instantanément. La solution devient blanche, laiteuse et présente l'effet Tyndall caractéristique des suspensions colloïdales. Dans cette étape, on ajoute de préférence la phase liquide obtenue dans l'étape (1) à la phase liquide obtenue dans l'étape (2), notamment si celle-ci est aqueuse mais l'inverse est toutefois possible comme le montrent les exemples.

La "substance" utilisée selon le procédé de l'invention peut être pratiquement n'importe quelle substance suffisamment soluble dans un solvant donné,

à l'exception d'une substance polymérisable tel qu'un monomère.

La "substance" peut être en particulier un polymère, aussi bien un polymère synthétique, par exemple l'acide poly (D,L) lactique (PLA), etc., un polymère hémisynthétique comme par exemple l'acétate butyrate de cellulose, l'éthylcellulose, le phtalate d'hydroxyméthyl-propylcellulose (HPMCP), etc., qu'un polymère naturel, par exemple la gélatine, la gomme arabique, etc. De nombreux autres polymères peuvent être utilisés, par exemple : l'acéto-phtalate de polyvinyle, l'acéto-phthalate de cellulose; des dérivés maléiques (par ex. "Gantrez"®); les copolymères d'acide acrylique et d'acrylates et les polymères acryliques (par ex. Eudragit®); l'acide polylactique D ou L, et (D,L); les copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique, polypeptides, glycolides (dérivés de propiolactone, butyrolactone, pivalolactone ϵ -caprolactone, etc); les polymères obtenus à partir d'esters cycliques des acides hydroxybutyrique, hydroxyisobutyrique,

hydroxyméthylvalérique, phényl-lactique, hydroxyéthylbutyrique; le poly bêta malate de benzyle; les copolymères de l'acide malique et du malate de benzyle; un copolymère polyvinylpyrrolidone-acétate de vinyle réticulé, les polycyanoacrylates d'alkyle; les poly (éthylène-vinylacétate); les polymères hydrosolubles (gélatine, gomme arabique, méthylcellulose, etc); les oligomères (styrène allyl alcool).

La "substance" peut être un corps gras, par exemple un mono-, di- ou tri-glycéride d'acide gras; une huile hydrogénée comme par exemple l'huile de ricin hydrogénée, une huile solide à température ambiante, comme par exemple l'huile de coprah; une cire, comme par exemple la cire d'abeille; un ester d'acide gras de polyéthylène-glycol (PEG), comme par exemple le distéarate de PEG 6000:

La "substance" peut aussi être une substance biologiquement active, notamment un principe actif médicamenteux ou un précurseur de principe actif médicamenteux, ou encore un produit de contraste ou un réactif biologique. Dans ce cas, il peut être intéressant de préparer des nanoparticules comprenant à la fois une substance biologiquement active et un polymère en tant que "substance", comme on le verra plus loin.

La "substance" peut aussi être un pigment, une encre, un lubrifiant, un agent de traitement de surface, etc.

Il est évident que le procédé selon l'invention peut s'appliquer aussi bien pour une substance que pour plusieurs.

A cet égard, selon une variante du procédé, on peut fixer une seconde substance par adsorption à la surface de nanoparticules déjà formées dans l'étape (3), par simple addition à la suspension colloïdale du polymère, éventuellement après concentration. Cette seconde substance peut être en particulier une substance biologiquement active.

Le "solvant" ou le mélange de solvants utilisé est un liquide capable de dissoudre la substance (par exemple le polymère et/ou la substance biologiquement active). Par ailleurs le solvant doit être miscible en toutes proportions avec le non-solvant de la substance utilisé dans la préparation. Ainsi, dans la plupart des cas, le solvant sera organique de sorte que la phase liquide (1) constituera la phase organique tandis que la phase liquide (2) pourra constituer la phase aqueuse, mais il est possible d'utiliser soit deux phases organiques soit deux phases aqueuses dans la mesure où les conditions de solubilité, d'insolubilité et de miscibilité sont remplies. D'un autre côté, le solvant devra être suffisamment volatil pour pouvoir éventuellement être éliminé. Par exemple, dans le cas où la substance est un polymère (additionné ou non d'une substance biologiquement active), le solvant peut être choisi parmi un alcool inférieur (méthanol,

éthanol, isopropanol), une cétone inférieure (acétone, méthyl-éthyl-cétone), un hydrocarbure léger ou un mélange d'hydrocarbures légers (hexane, éther de pétrole) un hydrocarbure léger chloré (chloroforme, chlorure de méthylène, trichloréthylène, etc), ou d'autres solvants légers usuels tels que l'acétonitrile, le dioxanne.

Le "non-solvant", ou le mélange de non-solvants de la substance est un liquide ne dissolvant pas la substance tout en étant miscible en toutes proportions au solvant utilisé. Ainsi, par exemple, lorsque la substance est un polymère tel que P.L.A., le solvant peut être l'acétone et le non-solvant peut être l'éthanol ou l'eau distillée; si la substance est par exemple un polymère acrylique tel que Eudragit L100®, le solvant peut être une phase aqueuse alcaline et le non-solvant peut être une phase aqueuse acide. Il peut être avantageux d'ajouter au solvant une faible proportion (inférieure à 20% en volume, par exemple environ 10% en vol.) de non-solvant, dans la phase liquide (1), ce qui permet d'obtenir des nanoparticules plus petites, notamment inférieures à 100 nm.

Il est souhaitable, pour obtenir une suspension plus stable, d'ajouter un ou plusieurs surfactifs (ou émulsifiants). Les surfactifs peuvent être anioniques (par exemple laurylsulfate de sodium), cationiques (par exemple ammonium quaternaire) ou non ioniques (par exemple monoesters de sorbitanne polyoxyéthylénés ou non, éthers d'alcools gras et de polyoxyéthylène-glycols, polyoxyéthylène-polypropylène glycol).

Toutefois, les nanoparticules peuvent être obtenues selon l'invention sans surfactifs, et ceux-ci ne sont d'ailleurs pas nécessaires si dans l'étape (4) la totalité des solvants et des non-solvants est éliminée, par exemple par lyophilisation. On peut ainsi obtenir des nanoparticules lyophilisées dont la conservation est de longue durée.

La proportion en surfactifs dans la suspension colloïdale obtenue dans l'étape (3) lorsqu'ils sont présents, peut aller notamment de 0,1% à 10% en poids, et de préférence entre 0,2 et 2% en poids.

Dans le cas où la substance est un polymère, la concentration du polymère dans le solvant ou le mélange de solvants peut être comprise entre 0,1 et 10%, de préférence entre 0,2 et 2% en poids.

Le rapport de volumes des solvants et des non-solvants doit être tel qu'il puisse permettre la précipitation du polymère. Lorsque ce rapport augmente, la taille des nanoparticules diminue.

L'agitation modérée de la préparation dans l'étape (3) est liée à la quantité de produits mise en oeuvre. Elle n'est pas nécessaire pour de faibles quantités.

L'influence de la température et de pH sont limitées dans le procédé selon l'invention, de sorte qu'il n'est généralement pas nécessaire d'opérer

dans des conditions particulières. Toutefois, lorsqu'on utilise deux phases aqueuses (1) et (2), leurs pH respectifs devront être différents, pour remplir respectivement les conditions de solvant et de non-solvant.

Par ailleurs, la présence d'électrolyte (par exemple le chlorure de sodium) ne semble pas avoir d'influence sur l'obtention des nanoparticules. Ainsi après formation des nanoparticules dans l'exemple 1, une concentration de 25 mg/ml de chlorure de sodium n'entraîne pas de coalescence ou de précipitation des nanoparticules formées.

Les particules obtenues selon l'invention sont autoclavables si les propriétés physiques de la substance le permettent.

Le procédé d'obtention de nanoparticules selon l'invention apporte les avantages suivants par rapport aux procédés connus:

- obtention de nanoparticules inférieures à 500 nm et notamment d'environ 200 nm par une méthode simple ne nécessitant pas un grand apport d'énergie;
- dans le cas où la substance comprend un polymère, les nanoparticules ne sont plus obtenues par polymérisation d'un monomère mais par "nanoprécipitation" d'un polymère bien défini;
- utilisation de polymères naturels aussi bien que synthétiques dont l'innocuité est reconnue et l'application dans le domaine de la santé est très ancienne;
- utilisation de polymères qui, selon leur nature, peuvent être biocompatibles;
- possibilité d'utilisation de polymères qui peuvent se dissoudre à partir d'un certain pH dans l'organisme, d'où l'assurance d'une non-concentration dans l'organisme de particules de polymères;
- possibilité d'utilisation de polymères qui, selon leur nature peuvent être biorésorbables, les produits de dégradation étant d'une totale innocuité;
- obtention de particules sphériques avec une faible dispersion des tailles.

Les exemples suivants illustrent l'invention. Les nanoparticules obtenues sont visibles au microscope électronique à transmission (x 25000-150000) et se présentent, après coloration négative avec l'acide phosphotungstique, sous la forme de particules non contrastées sensiblement rondes.

Exemple 1 : Préparation de nanoparticules de polymères.

On dissout d'une part, 125 mg d'acide poly (d,l) lactique (P.L.A.) dans 25 ml d'acétone et, d'autre part, 125 mg de polymère mixte d'oxyde d'éthylène et de propylène-glycol (Pluronic F68 ®

ou Poloxamer 188®), agent de surface non ionique, dans 50 ml d'eau purifiée.

On ajoute, sous agitation magnétique (100 r.p.m.), la phase acétonique à la phase aqueuse. Le milieu devient immédiatement opalescent par formation de nanoparticules du polymère (P.L.A.). La taille moyenne des nanoparticules, mesurée aussitôt après préparation dans un diffractomètre à rayon laser (Nanosizer® de la firme Coultronics), est de 200 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,5.

L'acétone est éliminée sous pression réduite (vide de la trompe à eau), puis la suspension est concentrée dans ces mêmes conditions jusqu'au volume désiré, par exemple : 10 ml.

La suspension concentrée de nanoparticules est filtrée sur un verre fritté (pores 9-15 µm) ou sur une membrane filtrante (pores 5 µm), et la taille des nanoparticules, à nouveau mesurée dans le filtrat, demeure inchangée ainsi que l'indice de dispersion. L'examen en microscopie électronique à transmission montre l'aspect sphérique régulier des nanoparticules d'acide (d,l) polylactique.

Après un repos prolongé (18 mois), l'aspect de la suspension de nanoparticules demeure inchangé et on n'observe, en particulier, aucune sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanoparticules.

Exemple 2 (variante de l'exemple 1)

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant la phase aqueuse à la phase acétonique. Les nanoparticules obtenues présentent les mêmes caractéristiques qu dans l'exemple 1.

Exemple 3 (variante de l'exemple 1)

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant la phase acétonique à la phase aqueuse sans agitation du milieu. Les nanoparticules obtenues ont une taille moyenne de 205 nm avec un indice moyen de dispersion de 1.

Exemple 4 (variante de l'exemple 1)

On procède comme dans l'exemple 1, mais sans ajouter d'agent de surface à la phase aqueuse. Les nanoparticules obtenues ont une taille moyenne de 207 nm, avec un indice moyen de dispersion de 1,3.

Exemple 5: Préparation de nanoparticules contenant de l'indométacine (principe actif lipophile)

a) On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 5 mg d'indométacine dans la phase acétonique. Les nanoparticules obtenues ont

une taille moyenne de 180 nm avec un indice moyen de dispersion de 1,5. Après ultracentrifugation et dosage de l'indométacine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanoparticules représente 80% de la quantité initiale.

b) Essai pharmacologique :

Administrée par voie orale chez le rat à jeun (5 mg/kg d'indométacine) la suspension de nanoparticules conduit à une absorption digestive de l'indométacine plus rapide et plus complète que celle observée après administration de la même dose d'indométacine en solution. Après administration répétée chez le rat à jeun (5mg/kg d'indométacine, 3 jours de suite), la suspension de nanoparticules conduit à une meilleure tolérance digestive, objectivée par le nombre des ulcérations et hémorragies, que celle observée après administration de la même dose d'indométacine en solution.

Administrée par voie intraveineuse chez le rat (5 mg/kg d'indométacine) la suspension de nanoparticules conduit à un profil chronologique des concentrations plasmatiques d'indométacine mettant en évidence, par rapport à l'injection d'indométacine en solution, une distribution extravasculaire plus importante du principe actif (majoration d'un facteur voisin de 2 du volume de distribution de l'indométacine), suivie d'une élimination plus lente (majoration d'un facteur voisin de 2 de la demi-vie biologique de l'indométacine).

Exemple 6: Préparation de nanoparticules contenant de la doxorubicine (principe actif hydrophile)

a) On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 12,5 mg de doxorubicine dans la phase aqueuse. Les nanoparticules obtenues ont une taille moyenne de 288 nm et un indice moyen de dispersion de 2. Après ultracentrifugation et dosage de la doxorubicine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanoparticules représente 50% de la quantité initiale.

b) Essai pharmacologique : Administrée à la dose de 10 mg/kg pendant trois jours chez le rat, la suspension de nanoparticules de doxorubicine a montré une nette amélioration de la toxicité cardiaque du principe actif par rapport à son administration en solution, résultats comparables à ceux observés par COUVREUR et coll. (J. Pharm. Sci., 71, p. 790, (1982) avec des nanoparticules préparées par polymérisation d'isobutylcyanoacrylate.

Exemple 7 : Fixation d'un principe actif (doxorubicine) sur des nanoparticules de polymère.

On procède comme dans l'exemple 1. Puis, on ajoute à la suspension de nanoparticules de P.L.A., concentrée sous un volume de 10 ml, 12,5 mg de doxorubicine. Après 72 h. de contact, la taille moyenne des nanoparticules est de 220 nm avec un indice moyen de dispersion de 2. Après ultracentrifugation et dosage de la doxorubicine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif fixé sur les nanoparticules représente 32% de la quantité initiale.

Exemple 8: Addition de non-solvant à la phase du solvant.

On procède comme dans l'exemple 1, mais le polymère est dissous dans un mélange acétone/eau (90/10, v/v), au lieu d'acétone pure. La présence d'une faible proportion de non-solvant du polymère dans son solvant, conduit à des nanoparticules dont la taille moyenne est de 90 nm avec un indice moyen de dispersion de 1,5.

Exemple 9: Utilisation de deux phases aqueuses.

a) D'une part, 625 mg d'un polymère acrylique (Eudragit L 100®) sont dissous dans 125 ml d'eau purifiée additionnée de 3,45 ml. de soude 0,1 N.

D'autre part, 625 mg de polymère mixte d'oxyde d'éthylène et de propylène glycol. (Pluronic F68 ®) sont dissous dans 250 ml d'eau purifiée additionnée de 0,85 ml d'acide acétique pur.

La phase aqueuse polymérique basique est ajoutée, sous agitation magnétique à la phase aqueuse acide. Les nanoparticules d'Eudragit L100® se forment immédiatement, rendant le milieu opalescent. Après concentration de la suspension sous pression réduite, la taille moyenne des nanoparticules est de 130 nm avec un indice moyen de dispersion de 2,3.

b) Préparation de comprimés. La suspension de nanoparticules d'Eudragit L 100 ® obtenue ci-dessus a été utilisée pour préparer une formulation d'enrobage de comprimés par pulvérisation. Les comprimés enrobés ont montré qu'ils étaient gastro-résistants pendant au moins 2 h, à pH acide (milieu gastrique de la Pharmacopée US) mais libéraient leur principe actif à pH neutre (milieu intestinal de la Pharmacopée US).

Exemple 10 : Utilisation de deux phases organiques polaires.

D'une part, 125 mg d'acide poly (d,l) lactique sont dissous dans 25 ml de tétrahydrofurane.

D'autre part, 125 mg de polymère mixte d'éthylène et de propylèneglycol (Pluronic F 68 ®)

sont dissous dans 50 ml d'éthanol absolu.

La phase polymérique est ajoutée, sous agitation magnétique, à la phase éthanolique. Les nanoparticules d'acide poly (d,l) lactique se forment immédiatement, rendant le milieu opalescent. Après concentration de la suspension, sous pression réduite et à faible température, jusqu'à un volume de 4 ml, suivie d'une filtration sur verre fritté (pores 9-15 µm), la taille moyenne des nanoparticules est de 201 nm avec un indice moyen de dispersion de 1,6.

Exemple 11: Utilisation de deux phases organiques apolaires.

a) D'une part, 125 mg de polymère acrylique (Eudragit L100 ®) sont dissous dans 25 ml de chloroforme.

D'autre part, 0,2 ml de mono-oléate de sorbitanne, (SPAN 80 ®, agent de surface non ionique) sont dissous dans 50 ml d'heptane.

On ajoute, sous agitation magnétique, la phase chloroformique à la phase heptanique. Les nanoparticules d'Eudragit L100® se forment immédiatement, rendant le milieu opalescent.

Après concentration de la suspension sous un volume de 30 ml, les nanoparticules ont une taille moyenne de 350 nm avec un indice moyen de dispersion de 1.

b) Préparation de comprimés.

Utilisée dans les mêmes conditions que dans l'exemple 9b, la suspension de nanoparticules d'Eudragit L100 ® a permis la fabrication, par enrobage, de comprimés gastro-résistants.

Exemple 12 : préparation de nanoparticules de lipide.

D'une part, 125 mg de stéarate de glycérol sont dissous dans un mélange acétone/tétrahydrofurane (90/10, v/v).

D'autre part, 0,25 ml de mono-oléate de sorbitanne polyoxyéthyléné (TWEEN 80®, agent de surface non ionique) sont dissous dans 50 ml d'eau purifiée.

On ajoute, sous agitation magnétique, la phase organique lipidique à la phase aqueuse. Les nanoparticules de stéarate de glycérol se forment immédiatement, rendant le milieu opalescent.

Après concentration de la suspension sous un volume de 10 ml, les nanoparticules ont une taille moyenne de 300 nm avec un indice moyen de dispersion de 3.

Exemple 13 (variante de l'exemple 12)

D'une part, 125 mg de palmito-stéarate de glycérol et 0,1 ml de mono-oléate de sorbitanne

(SPAN 80®) sont dissous dans 50 ml d'éthanol absolu.

D'autre part, 0,1 ml de mono-oléate de sorbitane polyoxythyléné (TWEEN 80®) sont dissous dans 50 ml d'eau purifiée.

On ajoute, sous agitation magnétique, la phase alcoolique lipidique à la phase aqueuse. Les nanoparticules de palmito-stéarate de glycérol se forment instantanément, rendant le milieu opalescent.

Après concentration de la suspension sous un volume de 10 ml, les nanoparticules ont une taille moyenne de 160 nm avec un indice moyen de dispersion de 2.

Exemple 14 : Préparation de nanoparticules d'indométacine.

a) On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais en remplaçant le polymère par 25 mg d'indométacine.

Après concentration de la suspension par évaporation du solvant organique, les nanoparticules d'indométacine ont une taille moyenne de 290 nm et un indice moyen de dispersion de 2. L'examen en microscopie électronique à transmission montre l'aspect sphérique et non cristallin des nanoparticules d'indométacine.

b) Essai pharmacologique

Administrée par voie orale chez le rat à jeun (5 mg/kg) la suspension de nanoparticules d'indométacine conduit à une absorption plus rapide et plus complète que celle observée par administration de doses égales d'indométacine en solution.

Administrée par voie intraveineuse chez le rat (5 mg/kg) la suspension de nanoparticules d'indométacine conduit à un profil chronologique des concentrations plasmatiques d'indométacine mettant en évidence, par rapport à l'injection de doses égales d'indométacine en solution, une distribution extravasculaire plus importante du principe actif (majoration du volume de distribution), suivie d'une élimination plus lente (majoration de la demi-vie biologique).

Exemple 15 : Lyophilisation des nanoparticules de polymère

On procède comme indiqué dans l'exemple 1. Après concentration de la suspension de nanoparticules de P.L.A. jusqu'à un volume de 20 ml, on ajoute à celle-ci 200 mg de tréhalose, puis on lyophilise.

Après dispersion du lyophilisat dans 10 ml d'eau purifiée, les nanoparticules ont une taille moyenne de 275 nm avec un indice moyen de dispersion de 1,5.

Exemple 16 : Stabilité des nanoparticules de polymère en présence de forces ioniques variables.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1. Après concentration de la suspension de nanoparticules de P.L.A. jusqu'à un volume de 10 ml, on ajoute progressivement à celle-ci des quantités croissantes de chlorure de sodium. La suspension de nanoparticules est parfaitement stable lorsque la concentration en chlorure de sodium correspond à l'isotonie avec le sang, et le demeure jusqu'à des concentrations en chlorure de sodium supérieure à 3 fois la concentration isotonique.

Exemple 17 : Préparation de nanoparticules en présence d'un sel.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais la phase aqueuse est additionnée de 90 mg de chlorure de sodium. Après concentration de la suspension de nanoparticules jusqu'à un volume de 10 ml, correspondant compte tenu du chlorure de sodium à l'isotonie avec le sang, les nanoparticules ont une taille moyenne de 250 nm avec un indice moyen de dispersion de 2.

La suspension demeure stable dans le temps et ne présente, après 12 mois de conservation, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanoparticules.

Les nanoparticules obtenues selon l'invention peuvent trouver des applications dans de nombreux secteurs techniques.

En tant que "vecteurs" de médicaments, en thérapeutique humaine et animale les nanoparticules permettent d'envisager :

- d'atteindre de nouveaux sites d'action, en particulier intracellulaires, voire intralysosomiaux ;
- d'utiliser de nouvelles voies d'administration pour des médicaments connus, en augmentant la stabilité et/ou l'absorption des médicaments, ou en permettant la réalisation de formes injectables, par voie intravasculaire, de médicaments insolubles ;
- de modifier la distribution tissulaire des médicaments, par un meilleur ciblage vers les sites d'action favorables et/ou un détournement des sites d'effets indésirables voire toxiques (amélioration de l'index thérapeutique).

En pharmacie, les dispersions colloïdales de nanoparticules peuvent permettre :

- de réaliser des formes injectables de médicaments insolubles,
- de stabiliser un principe actif médicamenteux, et
- de réaliser des enrobages de formes galéniques à partir de dispersions aqueuses de

polymères filmogènes.

Dans le domaine de l'agrochimie les nanoparticules peuvent véhiculer des insecticides, des pesticides etc... Leur taille peut permettre d'envisager une action plus puissante par une meilleure pénétration à travers la cuticule. La faible viscosité de la dispersion autorise une pulvérisation très facile sous forme de gouttelettes de très petite taille, plus efficaces car plus couvrantes.

Dans le domaine des peintures, vernis, et traitement des surfaces d'une manière générale, les nanoparticules permettent de véhiculer des pigments, des réactifs, des décapants sous forme de dispersion aqueuse de très faible viscosité, aisés à pulvériser ou à appliquer, et qui peut, si nécessaire, être rendue visqueuse, voir adhésive (remise en suspension des nanoparticules dans un véhicule approprié). La taille réduite des nanoparticules conduit à une très grande finesse du dépôt et à une très grande homogénéité, par exemple de pigmentation.

Les nanoparticules obtenues selon l'invention peuvent aussi être utilisées dans les domaines de l'imprimerie et de la reprographie, du traitement de surface des textiles et fibres, de la photographie, de la lubrification.

Revendications

1. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de particules sphériques de type matriciel et de taille inférieure à 500 nm (nanoparticules), caractérisé en ce que :

(1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de la substance dans un solvant ou dans un mélange de solvants, et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs,

(2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par un non-solvant ou un mélange de non-solvants de la substance et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs, le non-solvant ou le mélange de non-solvants de la substance étant miscible en toutes proportions au solvant ou mélange de solvants de la substance,

(3) on ajoute, sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanoparticules de la substance, et

(4) si l'on désire, on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants de la substance et du non-solvant ou du mélange de non-solvants de la substance, de manière à obtenir une suspension colloïdale de

concentration voulue en nanoparticules ou à obtenir une poudre de nanoparticules, la substance n'étant pas un monomère.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on ajoute dans l'étape (3) la phase liquide obtenue dans l'étape (1) à la phase liquide obtenue dans l'étape (2).
3. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'on ajoute au solvant, dans l'étape (1), une faible proportion de non-solvant.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le(s) surfactif(s) sont présents en une proportion de 0,1 à 10% en poids de la suspension colloïdale obtenue dans l'étape (3).
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le(s) surfactif(s) sont présents en une proportion de 0,2 à 2% en poids.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la substance est un polymère.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la concentration du polymère dans le solvant ou le mélange de solvants est comprise entre 0,1 et 10% en poids.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la concentration du polymère est comprise entre 0,2 et 2% en poids.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la substance est une substance biologiquement active.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisé en ce que la substance comprend un polymère et une substance biologiquement active.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisé en ce qu'une seconde substance est fixée sur les nanoparticules de polymère déjà formées dans l'étape (3).
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la seconde substance est une substance biologiquement active.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la subs-

tance est un corps gras.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que dans l'étape (4) la totalité des solvants et des non-solvants est éliminée par lyophilisation.
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que les nanoparticules ont une taille d'environ 200 nm.

Claims

1. Preparation process for dispersible colloidal systems of a substance, in the form of spherical particles of matrix type and of a size smaller than 500 nm (nanoparticles), characterized in that:

(1) a liquid phase is prepared constituted essentially by a solution of the substance in a solvent or in a mixture of solvents, and being able to have one or more surfactants added to it,

(2) a second liquid Phase is prepared constituted essentially by a non-solvent or a mixture of non-solvents of the substance and being able to have one or more surfactants added to it, the non-solvent or the mixture of non-solvents of the substance being miscible in all proportions with the solvent or mixture of solvents of the substance,

(3) one of the liquid phases obtained in (1) or (2) is added under moderate agitation to the other, so as to obtain almost instantaneously a colloid suspension of nanoparticles of the substance, and

(4) if desired, all or part of the solvent or mixture of solvents of the substance and of the non-solvent or mixture of non-solvents of the substance are eliminated, so as to obtain a colloid suspension of the desired nanoparticle concentration or so as to obtain a nanoparticle powder, the substance not being a monomer.

2. Process according to claim 1, characterized in that in stage (3) the liquid phase obtained in stage (1) is added to the liquid phase obtained in stage (2).
3. Process according to claim 1 or claim 2, characterized in that in stage (1) a small amount of non-solvent is added to the solvent.
4. Process according to any one of claims 1 to 3, characterized in that the surfactant(s) is(are) present in a proportion of 0.1 to 10% by

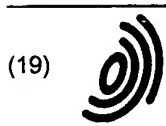
weight of the colloid suspension obtained in stage (3).

5. Process according to claim 4, characterized in that the surfactant(s) is(are) present in a proportion of 0.2 to 2% by weight.
6. Process according to any one of claims 1 to 5, characterized in that the substance is a polymer.
7. Process according to claim 6, characterized in that the polymer concentration in the solvent or the mixture of solvents is comprised between 0.1 and 10% by weight.
8. Process according to claim 7, characterized in that the polymer concentration is comprised between 0.2 and 2% by weight.
9. Process according to any one of claims 1 to 5, characterized in that the substance is a biologically active substance.
10. Process according to any one of claims 6 to 8, characterized in that the substance contains a polymer and a biologically active substance.
11. Process according to any one of claims 6 to 8, characterized in that a second substance is fixed on the polymer nanoparticles already formed in stage (3).
12. Process according to claim 11, characterized in that the second substance is a biologically active substance.
13. Process according to any one of claims 1 to 5, characterized in that the substance is a fatty substance.
14. Process according to any one of claims 1 to 13, characterized in that in stage (4) all the solvents and nonsolvents are eliminated by lyophilization.
15. Process according to any one of claims 1 to 14, characterized in that the nanoparticles have a size of about 200 nm.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung kolloid-disperser Systeme aus einer Substanz in Form kugelförmiger, matrixartiger Teilchen von unter 500 nm Größe (Nanopartikel), dadurch gekennzeichnet, daß
 - (1) man eine flüssige Phase herstellt, wel-

- che im wesentlichen aus einer Lösung der Substanz in einem Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch besteht und welcher ein oder mehrere oberflächenaktive Stoffe zugesetzt sein können,
- (2) man eine zweite flüssige Phase herstellt, welche im wesentlichen aus einem Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch besteht, welche die Substanz nicht lösen, und welcher ein oder mehrere oberflächenaktive Stoffe zugesetzt sein können, wobei das Lösungsmittel oder das Lösungsmittelgemisch, welche die Substanz nicht lösen, in allen Verhältnissen mit dem Lösungsmittel oder dem Lösungsmittelgemisch für die Substanz mischbar sind,
- (3) man unter mäßigem Rühren eine der in (1) oder (2) erhaltenen flüssigen Phasen der anderen zufügt, um praktisch augenblicklich eine kolloidale Suspension von Nanopartikeln der Substanz zu erhalten, und
- (4) falls gewünscht, man das gesamte oder einen Teil des Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches für die Substanz und des Lösungsmittels oder des Lösungsmittelgemisches, welche die Substanz nicht lösen, entfernt, um eine kolloidale Suspension der gewünschten Nanopartikel-Konzentration zu erhalten oder ein Nanopartikel-Pulver zu erhalten, wobei die Substanz kein Monomer ist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt (3) die in Schritt (1) erhaltene flüssige Phase der in Schritt (2) erhaltenen flüssigen Phase zufügt.
 3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt (1) dem Lösungsmittel ein nichtlösendes Lösungsmittel in geringem Verhältnis zusetzt.
 4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das (die) oberflächenaktive(n) Mittel in einem Verhältnis von 0,1 bis 10 Gew.-% bezogen auf die in Schritt (3) erhaltene kolloidale Suspension vorhanden sind.
 5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das (die) oberflächenaktive(n) Mittel in einem Verhältnis von 0,2 bis 2 Gew.-% vorhanden sind.
 6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz ein Polymer ist.
 7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Polymers im Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch zwischen 0,1 und 10 Gew.-% liegt.
 8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Polymers zwischen 0,2 und 2 Gew.-% liegt.
 9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz eine biologisch aktive Substanz ist.
 10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz ein Polymer und eine biologisch aktive Substanz umfaßt.
 11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine zweite Substanz an die bereits in Schritt (3) gebildeten Polymer-Nanopartikel angelagert wird.
 12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Substanz eine biologisch aktive Substanz ist.
 13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz ein Fett ist.
 14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (4) die gesamten Lösungsmittel und nichtlösenden Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt werden.
 15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Nanopartikel eine Größe von etwa 200 nm haben.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 0 988 863 A3**

(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(88) Date of publication A3:
09.08.2000 Bulletin 2000/32

(43) Date of publication A2:
29.03.2000 Bulletin 2000/13

(21) Application number: 99117908.6

(22) Date of filing: 13.09.1999

(51) Int. Cl.⁷: **A61K 47/32**, A61K 31/404,
A61K 31/496, A61K 31/5517,
A61K 31/166, A61K 31/15

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Designated Extension States:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priority: 22.09.1998 US 101336 P
28.05.1999 US 136531 P

(71) Applicant:
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
4070 Basel (CH)

(72) Inventors:
• **Albano, Antonio A.**
Clifton, New Jersey 07013 (US)

• **Phuapradit, Wantanee**
Clifton, New Jersey 07013 (US)
• **Sandhu, Harpreet K.**
West Orange, New Jersey 07052 (US)
• **Shah, Navnit Hargovindas**
Clifton, New Jersey 07012 (US)

(74) Representative:
Wächter, Dieter Ernst, Dr. et al
F.Hoffmann-La Roche AG
Patent Department (PLP),
124 Grenzacherstrasse
4070 Basel (CH)

(54) **Stable complexes of poorly soluble compounds**

(57) Stable water-insoluble complexes of poorly soluble compounds molecularly dispersed in water-insoluble ionic polymers are disclosed. Useful insoluble ionic polymers have a molecular weight greater than about 80,000 D and a glass transition temperature equal to or greater than about 50°. The compounds are microprecipitated in the ionic polymers in amorphous form. The complexes according to the present invention significantly increase the bioavailability of poorly soluble therapeutically active compounds.

EP 0 988 863 A3



European Patent
Office

PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

which under Rule 45 of the European Patent Convention EP 99 11 7908
shall be considered, for the purposes of subsequent
proceedings, as the European search report

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
E	WO 99 47518 A (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 23 September 1999 (1999-09-23) * example 4 * * claims 1-8 *	16,17, 37-39,42	A61K47/32 A61K31/404 A61K31/496 A61K31/5517 A61K31/166 A61K31/15
X	WO 98 04551 A (F.HOFMANN-LA ROCHE AG.) 5 February 1998 (1998-02-05) * page 15 - page 16 * * claims 1-13,26,29 *	16,17, 37-39,42	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
			A61K
INCOMPLETE SEARCH			
<p>The Search Division considers that the present application, or one or more of its claims, does/do not comply with the EPC to such an extent that a meaningful search into the state of the art cannot be carried out, or can only be carried out partially, for these claims.</p> <p>Claims searched completely :</p> <p>Claims searched incompletely :</p> <p>Claims not searched :</p> <p>Reason for the limitation of the search:</p> <p>see sheet C</p>			
Place of search		Date of completion of the search	Examiner
MUNICH		14 June 2000	Economou, D
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
<p>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</p> <p>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons</p> <p>& : member of the same patent family, corresponding document</p>			

EPO FORM 1503 03.02 (P04C07)

BEST AVAILABLE COPY



European Patent
Office

INCOMPLETE SEARCH
SHEET C

Application Number
EP 99 11 7908

Claim(s) searched completely:
16-17, 37-39, 42

Claim(s) searched incompletely:
1-15, 18-36, 40-41, 43-46

Reason for the limitation of the search:

Present claims 1-15, 18-36, 40-41, 43-46 relate to an extremely large number of possible compounds, products and methods. Support within the meaning of Article 84 EPC and/or disclosure within the meaning of Article 83 EPC is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds, products or methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the products and methods related to the compounds I-VIII (see claims 16-17, 37-39 and 42 and description pages 7-9).

BEST AVAILABLE COPY

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 99 11 7908

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

14-06-2000

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9947518	A	23-09-1999	AU	3409999 A	11-10-1999

WO 9804551	A	05-02-1998	AU	4296397 A	20-02-1998
			CN	1226248 A	18-08-1999
			EP	0915870 A	19-05-1999
			HR	970415 A	31-08-1998

EPO FORM P0459

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

BEST AVAILABLE COPY